

PCT

EP0560969  
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C07K 13/00, A61K 39/095		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/07172 (43) Date de publication internationale: 15 avril 1993 (15.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00904 (22) Date de dépôt international: 29 septembre 1992 (29.09.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/12176 3 octobre 1991 (03.10.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : QUENTIN-MIL- LET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F- 69100 Villeurbanne (FR). LISSOLO, Ling [FR/FR]; 691, rue du Vallon, F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).		(74) Mandataires: LEMOINE, Michel etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, boulevard des Batignolles, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, US, brevet euro- péen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: SUBUNIT VACCINE FOR <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> INFECTIONS AND CORRESPONDING PURIFIED SUBUNITS (54) Titre: VACCIN DE SOUS-UNITE CONTRE LES INFECTIONS A <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> ET SOUS-UNITES CORRESPONDANTES A L'ETAT PURIFIE (57) Abstract <p>A purified lower molecular weight subunit of the human transferrin receptor of an <i>N. meningitidis</i> strain, and a pharmaceutical vaccine composition containing said purified subunit for preventing or controlling the effects of an <i>N. meningitidis</i> infection.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de <i>N. meningitidis</i>, sous forme purifiée ainsi qu'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention ou à l'atténuation des effets d'une infection à <i>N. meningitidis</i> qui contient ladite sous-unité sous forme purifiée.</p>			

Best Available Copy

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	TG	Togo
DE	Allemagne	ML	Mali	UA	Ukraine
DK	Danemark	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

5

**Vaccin de sous-unité contre les infections à *Neisseria meningitidis*  
et sous-unités correspondantes à l'état purifié**

10

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention des méningites causées par *Neisseria meningitidis*.

15

D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de méningites bactériennes.

20

On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

25

L'espèce *N. meningitidis* est sub-divisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

30

Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

35

Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparaît hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du séro groupe B autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

5 D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir des protéines humaines de transport du fer telles que la transferrine et la  
10 lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligable chez l'homme (de l'ordre de :  $10^{-18}$  M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

15 Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été  
20 purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparaît essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kD et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent moindre d'environ 70 kD, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en  
25 présence de SDS.

Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est appelé, par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, récepteur de la transferrine et les polypeptides le constituant, des sous-  
30 unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

De manière surprenante, on a maintenant trouvé que la sous-unité de haut poids moléculaire ne pourrait pas induire la production d'anticorps de type  
35 neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur serait capable de remplir cette fonction.

En conséquence, l'invention propose :

- 5 i) La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité, sous forme purifiée ; c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur ; et
- 10 ii) Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité ; en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur ;
- 15 iii) L'usage thérapeutique de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité ; en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur; et
- 20 iv) Une méthode de vaccination à l'encontre des infections à *N. meningitidis*, qui comprend l'acte d'administrer une quantité efficace d'un point de vue thérapeutique de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-
- 25 unité, en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement.

30 D'une manière générale, la sous-unité de moindre poids moléculaire peut être obtenue sous forme purifiée (c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire) notamment à partir d'un récepteur de la transferrine. Ce dernier peut être isolé à partir d'une souche de *N. meningitidis* préalablement cultivée dans un milieu carencé en fer sous forme libre notamment selon la méthode de Schryvers et al, WO 90/12591, décrite de manière similaire dans Schryvers et al, Infect. Immun. (1988) 56 (5) : 1144. Puis

35 le récepteur purifié est soumis à l'action d'un agent fortement dénaturant tel que l'urée 8M ou la guanidine HCl 6M. Les sous-unités dissociées sont finalement séparées par des méthodes chromatographiques classiques telles

qu'une chromatographie d'échange d'ions, une chromatographie hydrophobe ou de gel de filtration.

5 De manière alternative, la sous-unité de moindre poids moléculaire peut être produite en mettant en oeuvre les techniques du génie génétique. Le fragment d'ADN codant pour cette sous-unité peut être exprimé dans un système d'expression hétérologue (e.g. bactérie, levure, cellule de mammifère). La sous-unité est dans ce cas-là recueillie à partir d'une culture et purifiée. Ces méthodes sont en outre parfaitement adaptées à la production des fragments ou  
10 des analogues de la sous-unité.

Par "fragment de la sous-unité de moindre poids moléculaire", on signifie un peptide ayant une séquence d'acides aminés qui est incluse dans la séquence de la sous-unité. Par "analogue de la sous-unité de moindre poids moléculaire",  
15 on signifie une protéine ayant une séquence d'acides aminés qui présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée d'au moins 95 % avec la séquence de la sous-unité. Aux fins de la présente invention, il est bien entendu qu'un tel fragment ou un tel analogue doit conserver les propriétés immunogènes de la sous-unité.

20

Par rapport à la sous-unité Tbp2, les souches de *N.meningitidis* peuvent se répartir en 2 grands groupes :

- 25 - celles dont la sous-unité Tbp2 a un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ (souches dites de type 2394) ; et
- celles dont la sous-unité Tbp2 a un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ (souches dites de type 2169).

30

D'une manière générale, la sous-unité de moindre poids moléculaire utile aux fins de la présente invention peut avoir pour origine une souche de *N. meningitidis* de n'importe quel sérogroupe. De manière avantageuse, elle a pour origine une souche de *N. meningitidis* sérogroupe B. Selon un aspect de l'invention tout à fait préféré, elle a pour origine la souche de *N. meningitidis*  
35 B16B6, aussi appelée 2394 (B:2a:P1.2:L2.3) ou M982 aussi appelée 2169 (B:9:P1.9:L3.7) qui sont publiquement disponibles auprès de la Collection de

l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs CIP 7908 et CIP 7917.

5 A titre d'exemple, la sous-unité Tbp2 des souches 2394 et 2169 est décrite par référence à sa séquence d'acides aminés telle que montrée dans les identificateurs de séquences n°1 et 2 (SEQ ID N°1 et 2). Les poids moléculaires apparents de ces sous-unités sont respectivement 68-70 et 87 kD environ, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

10 Une composition pharmaceutique selon l'invention est notamment utile pour prévenir ou atténuer les effets d'une infection à *N. meningitidis*.

15 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe l'agent thérapeutique selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intra-musculaire ou par voie intra-veineuse, par exemple sous forme de suspension injectable. L'administration  
20 peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration.

25 Enfin une composition selon l'invention peut contenir une ou plusieurs sous-unités de moindre poids moléculaire selon qu'elles proviennent de différentes souches de *N. meningitidis*. Ainsi, selon un aspect particulier de l'invention, une composition pharmaceutique avantageuse comprend la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de type 2394 (poids moléculaire de 65 à 74 kD) et la sous-unité de  
30 moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de type 2169 (poids moléculaire de 75 à 90 kD).

35 De manière préférée, une composition selon l'invention comprend la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de la souche 2394 (poids moléculaire : 68-70 kD) et la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de la souche 2169 (poids moléculaire : 87 kD).

L'invention est décrite en détails dans les exemples ci-après.

**EXEMPLE 1 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2394, par chromatographie d'échanges d'ions.

#### 1A - Culture

Un lyophilisat de la souche *N. meningitidis* 2394 est repris dans environ 1 ml de bouillon Mueller-Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Mueller-Hinton contenant du sang cuit (5 %).

Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO<sub>2</sub>, la nappe bactérienne est recueillie pour ensemer 150 ml de BMH pH 7,2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie pendant 3 h à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7,2 supplémentés avec 30 µm d'éthylènediamine-di(o-hydroxyphenylacetic acid) (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer sous forme libre.

Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

#### 1B - Purification

La méthode de purification est essentiellement telle que décrite par Schryvers et al (supra).

Le culot bactérien obtenu en 1A est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8,0 (tampon A). La suspension est centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat



cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 xg. Le surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 xg.

5       Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et après dosage de protéines selon Lowry, la concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

10       A 1,4 ml de la suspension de membranes on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotinylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 min à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1M et incubé pendant 60 min à température ambiante.

15       Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine, Sigma) à 30 % (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5 % et 5 mM respectivement. Après une incubation de 15 min à 37°C sous agitation, on  
20       ajoute 1 ml de résine streptavidine-agarose (Pierce) préalablement lavée en tampon A. La suspension est incubée 15 min à température ambiante puis centrifugée à 1 000 xg pendant 10 min. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat direct est éliminé.

25       La résine est lavée par 3 volumes de colonne de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon Tris-HCl 50mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,05 % et de la  
30       guanidine HCl 2M. L'éluat est collecté en fraction dont le volume correspond à 1 Vol., dans des tubes contenant 1 Vol. de Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

35       Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8,0 contenant de l'urée 0,5 M, puis concentrées sur une cellule de concentration de type Amicon équipée de

membrane dont le seuil de coupure est de 10 000 Daltons à la concentration finale d'environ 3 mg de protéine/ml.

5 Une certaine quantité d'urée est ajoutée à la solution concentrée de façon que la concentration finale en urée soit de 8M, la concentration finale de la solution protéique restant comprise entre 2 à 3 mg/ml. La solution est incubée pendant 6 jours à 4°C.

10 Le mélange est ensuite chromatographié sur une résine échangeuse d'anions (Q-Sépharose Pharmacia) préalablement équilibrée dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant de l'urée 5M.

15 Dans ces conditions, la sous-unité de haut-poids moléculaire (Tbp1) est directement recueillie dans l'éluat direct tandis que la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est éluée par un gradient linéaire de 0 - 1 M NaCl dans le tampon A contenant du Sarkosyl 0,5 % et l'urée 5M. La densité optique à 280 nm est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

20 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C) puis la solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm.

25

Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à - 70°C.

30 **EXEMPLE 2 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine, à partir de la souche 2169.

35 La culture de la souche 2169 et la purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1.

**EXEMPLE 3 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine à partir de la souche *N. meningitidis* 2394 par chromatographie hydrophobe.

5 La culture de la souche *N. meningitidis* 2394, ainsi que les étapes de purification allant jusqu'à la préparation de la suspension membranaire sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

10 A un volume de la suspension de membranes, on ajoute un volume identique de Tris-HCl 50mM pH 8,0 contenant NaCl 2M, EDTA 20 mM, Sarkosyl 1 % (p/v). Le mélange est incubé 15 min à 37°C sous agitation douce. Puis un volume de cette suspension est mis en contact avec un volume identique de résine Sépharose 4B couplée à la transferrine humaine. Cette résine d'affinité a été couplée en greffant de la transferrine humaine (Sigma, St Louis  
15 USA) à du Sépharose 4B-CNBr (Pharmacia) selon les recommandations du fabricant. La densité du ligand est de 5 mg transferrine/ml de résine. Le contact se fait en bain pendant 1 h à température ambiante sous agitation rotative douce. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne, l'éluat direct est éliminé.

20 La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 NaCl 1M EDTA 10mM Sarkosyl 0,05 % et  
25 guanidine HCl 2M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV. Les fractions correspondant au pic d'éluat sont réunies et la protéine est précipitée par addition de trois volumes d'éthanol refroidi.

30 Après une nuit d'incubation à + 4°C, la protéine est recueillie par centrifugation pendant une heure à 10.000 x g. Le précipité est repris par un certain volume de tampon phosphate 10 mM pH 7,0 contenant NaCl 0,5 M, guanidine-HCl 5 M (tampon D) de façon à ce que la concentration finale en  
35 protéine soit d'environ 1mg/ml. La solution est mise en contact avec la résine de phényl-Sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le même

tampon. L'incubation se fait en bain sous agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante. Le gel est ensuite conditionné dans une colonne.

5 Dans ces conditions, la sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) est recueillie dans l'éluat direct, tandis que la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) est fixée sur la résine. La colonne est rincée par trois volumes de tampon D puis par 5 volumes de tampon phosphate 10 mM pH 7,0. Tbp2 est éluée par le tampon phosphate 10mM pH 7,0 contenant 0,5 % de Sarkosyl. L'excès de Sarkosyl contenu dans le tampon d'élu-  
10 tion de Tbp2 est éliminé par précipitation à l'éthanol, la protéine est ensuite reprise dans le tampon phosphate 50 mM pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C).

La solution est ensuite filtrée sur une membrane de porosité 0,22  $\mu$ m. Le contenu en protéine est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de  
15 tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

**EXEMPLE 4 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire à partir de la souche *N. meningitidis* 2169 par chromatographie hydrophobe.

20

La culture de la souche *N. meningitidis* 2169 et la purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine (Tbp2) sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'exemple 3.

25 **EXEMPLE 5 :** Mise en évidence de l'importance de la sous-unité de moindre poids moléculaire à titre d'agent vaccinal.

On évalue l'activité bactéricide de sérums spécifiquement dirigés contre la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) du récepteur de la transferrine des souches *N. meningitidis* 2394 et 2169.  
30

Pour ce faire, les sous-unités Tbp2 ont été préparées par chromatographie hydrophobe, tel que décrit dans les exemples 3 et 4.

35 Des lapins néo-zélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 50 $\mu$ g de Tbp2 isolée de la souche 2394 ou 2169, en présence d'adjuvant complet de Freund (Difco). 21 et 42 jours après la première

injection, les lapins reçoivent à nouveau 50  $\mu$ g de sous-unité Tbp2 purifiée, mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum des animaux est prélevé, puis décomplementé et filtré sur une membrane de porosité 0,45  $\mu$ m.

5

Une gamme de dilution de chacun des antisérums anti-Tbp2 2394 et anti-Tbp2 2169 est préparée en milieu M199 (Gibco). 200  $\mu$ l de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une macroplaque de titrage (8x12in.). Un essai témoin est réalisé avec 200  $\mu$ l de milieu M199. Dans chacun des puits on ajoute (i) 100  $\mu$ l d'une culture en phase de croissance exponentielle d'une souche de *N. meningitidis*, en milieu Mueller-Hinton contenant à 30  $\mu$ M EDDA et (ii) 100  $\mu$ l de complément (sérum de jeune lapin dilué).

10

15

Après 30 min d'incubation à 37°C sous agitation douce, on ajoute dans chaque puits, 1ml de milieu Mueller-Hinton contenant 1ml d'agar noble en surfusion. Après solidification du milieu, l'incubation est poursuivie 18-24 hrs à 37°C ; puis le nombre d'unités formant des colonies dans chaque puits est évalué. L'inverse de la dernière dilution d'antisérum en présence de laquelle on observe 50 % de lyse par rapport au témoin, correspond au titre bactéricide.

20

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Activité bactéricide des antisérums anti-Tbp2 2394 et anti-Tbp2 2169

Neisseria meningitidis	Activité bactéricide			
	Sérum anti-Tbp2 2394		Sérum anti-Tbp2 2169	
Souche séro groupe/type/sous type	préimmunisation	postimmunisation	préimmunisation	postimmunisation
2394 B, 2a, P1.2	< 8	512	-	-
2169 B, 9, P1.9	-	-	< 8	128

L'antisérum est bactéricide vis-à-vis de la souche à partir de laquelle Tbp2 a été purifiée démontrant que les anticorps anti-Tbp2 induits sont fonctionnels et ont la capacité de lyser la bactérie en présence de complément.

5

**EXEMPLE 6 :** Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

10 La solution stérile obtenue dans l'Exemple 3 ou 4 est décongelée. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 200 µg/ml d'un principe actif, on mélange stérilement les solutions suivantes :

15	- Solution contenant la sous-unité Tbp2 du récepteur 2394 (ou 2169) à 1 mg/ml dans du tampon C	200 ml
	- Eau physiologique tamponnée (PBS) à pH 6,0	300 ml
20	- Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al <sup>+++</sup> /ml	50 ml
	- Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS	10 ml
25	- PBS qsp	1000 ml

30 **EXEMPLE 7 :** Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

Les solutions stériles obtenues dans les Exemples 3 et 4 sont décongelées. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 100 µg/ml de chacun des principes actifs, on mélange stérilement les solutions suivantes :

35

-	Solution contenant la sous-unité Tbp2 du récepteur 2394 à 1mg/ml dans du tampon C	100 ml
---	---	--------

5	-	Solution contenant la sous-unité Tbp2 du récepteur 2169 à 1mg/ml dans du tampon C	100 ml
	-	Eau physiologique tamponnée (PBS) à pH 6,0	300 ml
10	-	Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al <sup>+++</sup> /ml	50 ml
	-	Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS	10 ml
	-	PBS qsp	1000 ml



SEQ ID NO : 1

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 *N. meningitidis* 2394.

Cys	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Glu	Thr	1	5	10	15
Val	Gln	Asp	Met	His	Ser	Lys	Pro	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Lys	Ser	20	25	30	
Gln	Pro	Glu	Ser	Gln	Gln	Asp	Val	Ser	Glu	Asn	Ser	Gly	Ala	Ala	35	40	45	
Tyr	Gly	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Pro	Arg	Arg	Asn	Ala	His	Phe	Asn	50	55	60	
Pro	Lys	Tyr	Lys	Glu	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Gly	Ser	Met	Asp	Trp	65	70	75	
Lys	Lys	Leu	Gln	Arg	Gly	Glu	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Arg	Asp	80	85	90	
<del>Glu</del>	<del>Leu</del>	<del>Glu</del>	<del>Lys</del>	<del>Lys</del>	<del>Arg</del>	<del>Gly</del>	<del>Ser</del>	<del>Ser</del>	<del>Glu</del>	<del>Leu</del>	<del>Ile</del>	<del>Glu</del>	<del>Ser</del>	<del>Lys</del>	95	100	105	
Trp	Glu	Asp	Gly	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Phe	Thr	110	115	120	
Tyr	Val	Arg	Ser	Gly	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Asn	Asn	Ile	Asp	125	130	135	
Ile	Lys	Asn	Asn	Ile	Val	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	140	145	150	
Tyr	Lys	Gly	Lys	Glu	Pro	Ser	Lys	Glu	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	155	160	165	
Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Trp	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Glu	Lys	170	175	180	
Gln	Arg	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Ser	185	190	195	
Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Arg	Asn	Gln	Ala	200	205	210	
Glu	Ala	Ser	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Phe	215	220	225	
Glu	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	230	235	240	
Asn	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Lys	Gln	Ile	Lys	245	250	255	



	Cys 1	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	
Asp Ser Val Asp Thr	Glu 15	Ala	Pro	Arg	Pro 20	Ala	Pro	Lys	Tyr	Gln 25	
Asp Val Ser Ser Glu	Lys 30	Pro	Gln	Ala	Gln 35	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly 40	
Tyr Gly Phe Ala Met	Arg 45	Leu	Lys	Arg	Arg 50	Asn	Trp	Tyr	Pro	Gly 55	
Ala Glu Glu Ser Glu	Val 60	Lys	Leu	Asn	Glu 65	Ser	Asp	Trp	Glu	Ala 70	
Thr Gly Leu Pro Thr	Lys 75	Pro	Lys	Glu	Leu 80	Pro	Lys	Arg	Gln	Lys 85	
Ser Val Ile Glu Lys	Val 90	Glu	Thr	Asp	Gly 95	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr 100	
Ser Ser Pro Tyr Leu	Thr 105	Pro	Ser	Asn	His 110	Gln	Asn	Gly	Ser	Ala 115	
Gly Asn Gly Val Asn	Gln 120	Pro	Lys	Asn	Gln 125	Ala	Thr	Gly	His	Glu 130	
Asn Phe Gln Tyr Val	Tyr 135	Ser	Gly	Trp	Phe 140	Tyr	Lys	His	Ala	Ala 145	
Ser Glu Lys Asp Phe	Ser 150	Asn	Lys	Lys	Ile 155	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp 160	
Gly Tyr Ile Phe Tyr	His 165	Gly	Glu	Lys	Pro 170	Ser	Arg	Gln	Leu	Pro 175	
Ala Ser Gly Lys Val	Ile 180	Tyr	Lys	Gly	Val 185	Trp	His	Phe	Val	Thr 190	
Asp Thr Lys Lys Gly	Gln 195	Asp	Phe	Arg	Glu 200	Ile	Ile	Gln	Pro	Ser 205	
Lys Lys Gln Gly Asp	Arg 210	Tyr	Ser	Gly	Phe 215	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser 220	
Glu Glu Tyr Ser Asn	Lys 225	Asn	Glu	Ser	Thr 230	Leu	Lys	Asp	Asp	His 235	
Glu Gly Tyr Gly Phe	Thr 240	Ser	Asn	Leu	Glu 245	Val	Asp	Phe	Gly	Asn 250	
Lys Lys Leu Thr Gly	Lys 255	Leu	Ile	Arg	Asn 260	Asn	Ala	Ser	Leu	Asn 265	

Asn	Asn	Thr	Asn	Asn	Asp	Lys	His	Thr	Thr	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Leu	270	275	280
Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Phe	Asn	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	285	290	295
Thr	Asp	Lys	Lys	Glu	Asn	Glu	Thr	Lys	Leu	His	Pro	Phe	Val	Ser	300	305	310
Asp	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Phe	Phe	Gly	Pro	Gln	Gly	Glu	315	320	325
Glu	Leu	Gly	Phe	Arg	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Lys	Val	Ala	Val	330	335	340
Val	Gly	Ser	Ala	Lys	Thr	Lys	Asp	Lys	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Ala	345	350	355
Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	360	365	370
Thr	Ser	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Ala	Val	375	380	385
Glu	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Asn	Phe	390	395	400
Ser	Asn	Ala	Ala	Gln	Leu	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Met	Ile	Pro	Leu	405	410	415
Leu	Pro	Lys	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Asn	Thr	Gln	Ala	Asp	Lys	Gly	420	425	430
Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Arg	Lys	Phe	Glu	His	Thr	Pro	435	440	445
Glu	Ser	Asp	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Gln	Thr	Asn	Gly	450	455	460
Ala	Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Gly	Asp	Thr	Asn	Gly	Lys	Thr	465	470	475
Lys	Thr	Tyr	Glu	Val	Glu	Val	Cys	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn	Tyr	Leu	480	485	490
Lys	Tyr	Gly	Met	Leu	Thr	Arg	Lys	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Met	Gln	495	500	505
Ala	Gly	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Glu	Gln	Val	510	515	520
Glu	Gln	Ser	Met	Phe	Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Thr	Asp	Glu	Lys	Glu	525	530	535
Ile	Pro	Thr	Asp	Gln	Asn	Val	Val	Tyr	Arg	Gly	Ser	Trp	Tyr	Gly	540	545	550
His	Ile	Ala	Asn	Gly	Thr	Ser	Trp	Ser	Gly	Asn	Ala	Ser	Asp	Lys	555	560	565
Glu	Gly	Gly	Asn	Arg	Ala	Glu	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Ala	Asp	Lys	570	575	580

[illegible]

### Revendications

1. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité, sous forme purifiée.
2. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée.
3. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* séro groupe B, sous forme purifiée.
4. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ.
5. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de la souche de *N. meningitidis* 2394, sous forme purifiée.
6. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ.
7. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* 2169, sous forme purifiée.
8. Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un

fragment ou un analogue de ladite sous-unité ; en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur.

9. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 8, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*.
10. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis* séro groupe B.
11. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ.
12. Une composition pharmaceutique selon la revendication 11, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2394.
13. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ.
14. Une composition pharmaceutique selon la revendication 13, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2169.
15. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend à titre d'agent thérapeutique :
  - i) une première sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une première souche de *N.*

*meningitidis* ; ladite première sous-unité ayant un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ ; et

- ii) une seconde sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une seconde souche de *N. meningitidis* ; ladite seconde sous-unité ayant un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ ;

en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur desdites première et deuxième souches de *N. meningitidis*.

16. Une composition pharmaceutique selon la revendication 15, qui comprend à titre d'agent thérapeutique :

- i) la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2394 ; et
- ii) la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2169 ;

en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur des souches de *N. meningitidis* 2394 et 2169.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR92/00904

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.: <sup>5</sup> C07K13/00 A61K39/095

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.: <sup>5</sup> C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 1 November 1990 cited in the application see the whole document  -----	1-6,8-13
X,P	WO,A,9 203 467 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 5 March 1992 see page 8, line 10 - page 10, line 35 see page 21, line 5 - page 23, line 13 see page 37, line 1 - line 26  -----	1-3,6,8-10,13
X	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 58, No. 9, September 1990, WASHINGTON US pages 2875 - 2881 NIRUPAMA BANERJEE-BHATNAGAR ET AL  .../...	1-4,6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 1993 (15.01.93)

Date of mailing of the international search report

08 February 1993 (08.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR92/00904

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	"Expression of neisseria meningitidis Iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential use as vaccines" see the whole document -----	
X	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 56, No. 5 May 1988, WASHINGTON US pages 1144 - 1149 SCHRYVERS A. ET AL "Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from neisseria meningitidis" see the whole document -----	1-6
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 111, No. 17, 23 October 1989, Columbus, Ohio, US; abstract No. 150244, SCHRYVERS A. ET AL "identification and characterization of the transferrin receptor from neisseria meningitidis" page 389 ; column 2 ; see abstract & Mol.Microbiol. 1988 2(2),281-288 -----	1-6

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9200904  
SA 66294

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

15/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A- 5526190	16-11-90
		US-A- 5141743	25-08-92
WO-A-9203467	05-03-92	AU-A- 8747791	17-03-92

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 92/00904

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C07K13/00; A61K39/095

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté<sup>9</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 1 Novembre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-6,8-13
X,P	WO,A,9 203 467 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 5 Mars 1992 voir page 8, ligne 10 - page 10, ligne 35 voir page 21, ligne 5 - page 23, ligne 13 voir page 37, ligne 1 - ligne 26 --- -/--	1-3,6, 8-10,13

<sup>o</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 JANVIER 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08.02.

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

FERNANDEZ Y BRA F.

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA  
DEUXIEME FEUILLE)

**numéro PCT/ISA/210 (feuille supplémentaire) (Octobre 1991)**

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200904  
SA 66294

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

15/01/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A- 5526190	16-11-90
		US-A- 5141743	25-08-92
WO-A-9203467	05-03-92	AU-A- 8747791	17-03-92

EPO FORM P0012

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**